

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）  
総合研究報告書

血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

研究分担者 大隈 和 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨：近年我が国では Dengue ウイルスの国内感染例の発生や海外での重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) の同定に伴う国内感染例の確認等がなされ、国際的な人の移動や新たな病原体の発見等に伴う新興・再興感染症病原体の献血血液等への混入リスクは益々認知されている。そのため、血液への混入状況をいち早く察知し血液製剤のリスクを低減化する必要がある。そこで本研究では、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献することを目的に、既に国内感染が認められ献血血液等におけるスクリーニング法の整備が急がれる SFTSV の高感度核酸検査法の確立を目指した。これまでに大規模スクリーニング用のプライマーセットをデザインして作製し、プローブと併せてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニングした。その結果、増幅効率が最良のオリゴセットを最終的に同定した。このプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム RT-PCR 法の性能評価（検出感度、検出特異性）を実施し、またいくつかの SFTSV 特異的リアルタイム RT-PCR 法との比較検討も行った。さらに新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の国内での感染拡大を踏まえ、血液への混入リスク対策として血中ウイルスを検出可能な SARS-CoV-2 核酸検査法の開発を急遽検討した。

研究協力者

手塚健太 国立感染症研究所 血液・安全性研究部主任研究官

浜口 功 同上 部長

（本研究は、国立感染症研究所 ウイルス第1部、日本赤十字社 [JRC] との共同研究である。）

A．研究目的

輸血用血液を含む血液製剤は、ヒトの血液を原料とすることからウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。そのため血液製剤の安全性を担保する上で、血液への病原体の混入をいち早く検出、防止し製造過程より病原体を排除することは極めて重要な課題である。本邦で製造される血液製剤

は、抗体検査や NAT 等極めて精度の高い方法によって病原体スクリーニングが実施され、その安全性が担保されてきた。しかしながら、新興・再興感染症の原因ウイルス等に対する検査体制については十分な整備がなされておらず、日本国内への移入に備え早急な対応が求められている。

ダニ媒介性のウイルス感染症である重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) は、国内では西日本を中心に存在していることが近年分かっており、一部の発症者では重篤化することが知られている。原因ウイルスである重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) はウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。

現在既に感染者診断のための検査法は確立されているが、SFTSV が血液に微量に混入した場合に検出が可能な、より高感度の検出法はまだ確立されていない。

そこで本研究では、血液製剤の安全性強化に向けた SFTSV 等に対する新規高感度マルチプレックス核酸検査法を開発することを目的とした。具体的には、核酸検査用の高感度プライマー・プローブセットをデザイン後作製し、大規模スクリーニングすることにより、新規に高感度プライマー・プローブセットを複数同定し、新規マルチプレックス PCR 法を確立することを目指した。

## B . 研究方法

### ・新規SFTSV核酸検査法開発のための大規模プライマーセットのスクリーニング

Primer Express ver3ソフトウェア(Life Technologies)を使い、大規模スクリーニング用のプライマーセットを設計し作製した。これらのオリゴセットをリアルタイムRT-PCRによりスクリーニング(SYBR)し、最も増幅効率の良好なセットを選別した。

### ・SFTSV Japanese株・Chinese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

選別されたプライマーをもとにプローブを作製し、SFTSV Japanese株由来RNAパネル (J1 : 4株、J2 : 2株、J3 : 2株)、Chinese株由来RNAパネル (C3 : 1株、C4 : 2株、C5 : 2株)を鋳型として再度リアルタイムRT-PCRによるスクリーニング(TaqMan)を実施し、最終的に最も増幅効率の良好なプライマー・プローブセットを選択した。

### ・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプラ

### イマー・プローブセットの特異性評価

これまでに同定したSFTSVの新規高感度プライマーおよびTaqManプローブのセットの中で良好な性能を示すと考えられる12セットについて、健常者血漿由来のRNAを用いて非特異的増幅反応の有無を評価した。

### ・合成ssRNAを用いた絶対感度の評価

特に性能が優れていると考えられるプライマー・プローブセット(S-60)に対して合成ssRNAを作製した。これを用いて、低コピー段階希釈検体を作製し、PCR系の絶対感度を評価した。

### ・SFTSV Japanese株およびChinese株を用いた低コピーウイルスパネルの作製

SFTSV Japanese株 (J1 : 4株、J2 : 2株、J3 : 2株)およびChinese株 (C3 : 1株、C4 : 2株、C5 : 2株) 由来RNAに対して、S-60セットを用いたSFTSV S-segmentコピー数の絶対定量を実施した。定量結果より各株のRNAを希釈し、低いコピー (10コピー/ $\mu$ L) のウイルスパネルを作製した。

### ・低コピーウイルスパネルを用いたSFTSV核酸検査系の性能評価

低コピーウイルスパネルを鋳型として、本研究課題により開発したS-60セットと、既に明らかになっている他の研究グループによる核酸検査系との検出感度の比較検討を実施した。

### ・SARS-CoV-2核酸検査法開発のための大規模プライマーセットの作製

大規模スクリーニング用のプライマーセットを設計し作製した。

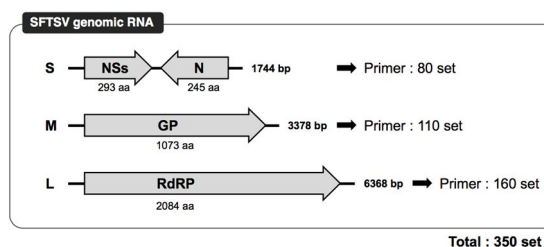
## C. 研究結果

### ・新規SFTSV核酸検査法開発のための大規模プライマーセットのスクリーニング

大規模スクリーニング用のプライマーセットを J1 株に対し、S 分節を 80 セット、M 分節を 110 セット、L 分節を 160 セット (合計 350 セット) デザインして合成した。

これらのオリゴセットを J1 株を鋳型にしてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (SYBR) したところ、最も増幅効率の良好な S 分節を 23 セット、M 分節を 28 セット、L 分節を 45 セット (合計 96 セット) 選別した。また、J2 株・J3 株を鋳型にしてさらに同様にスクリーニング (SYBR) したところ、最も増幅効率の良好な S 分節を 3 セット、M 分節を 3 セット、L 分節を 9 セット (合計 15 セット) 選別した。

SFTSV のゲノム構造と核酸検出用プライマーの設計



### ・SFTSV Japanese 株・Chinese 株を用いた TaqMan スクリーニングによる高感度プローブの決定

大規模スクリーニングにより同定した 15 セットの SFTSV の新規高感度プライマーに対して TaqMan プローブをデザインしたところ、このうち 12 セットのプローブ作製に成功した。

そこで、SFTSV Japanese 株由来 RNA パネルを鋳型として real-time PCR によるスクリーニングを実施した結果、12 セットのプ

ライマー・プローブの内、全ての SFTSV Japanese 株に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを 1 セット (S-62) 同定した。

また、SFTSV Chinese 株由来 RNA パネルを鋳型として real-time PCR によるスクリーニングを実施した結果、12 セットのプライマー・プローブの内、C3 および C4 に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを 1 セット (S-62)、C5 に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを 1 セット (S-60) それぞれ同定した。C3 および C4 株を高感度に検出するオリゴセットは、全ての Japanese 株を高感度に検出するオリゴセットと同一であった。一方、C5 株を高感度に検出するオリゴセットは他の株では十分な感度が得られなかった。

スクリーニング最終結果

	Primer Design	SYBR Screening		Taqman screening	
		Strain J1	Strain J2 & J3		
S-segment	80	23	3	2	2
M-segment	110	28	3	2	0
L-segment	160	45	9	8	0

### ・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプライマー・プローブセットの特異性評価

これまでに同定したプライマー・プローブセットの特異性評価のため、健常者プール血漿由来 RNA を鋳型として PCR を実施した結果、12 セット中 11 セットでは全く増幅シグナルは認められなかった。一方、12 セット中 1 セット (S-62) では全ての PCR 反応で増幅シグナルが確認され、非特異的な増幅反応が高率で引き起こされることが示された。

### ・合成ssRNAを用いた絶対感度の評価

S-60セットに対する合成ssRNAを用いて、PCR鑄型量を段階的に希釈し（100, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 cp/rxn）感度を評価した結果、鑄型量100, 20, 10 cp/rxn において検出率は100%であった（8重測定中8検出）。一方、鑄型量5, 2.5, 1.25 cp/rxn においては、それぞれ検出率88%, 75%, 38%であった。

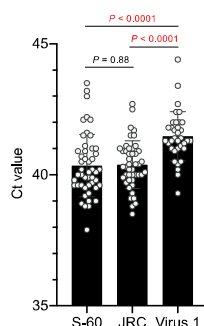
・ SFTSV Japanese株およびChinese株を用いた低コピーウイルスパネルの作製

S-60セットはssRNAを鑄型量10 cp/rxn において100%検出することから、SFTSV臨床分離株由来RNAを用いた同様の感度評価が求められた。臨床分離株の低コピーウイルスパネルを作製するために、S-60セットを用いたRNA溶液の絶対定量を実施した。その結果、全ての株の定量結果に基づき、低いコピー数（10コピー/μL）のウイルスパネル作製に成功した。

・ 低コピーウイルスパネルを用いたSFTSV核酸検査系の性能評価

臨床分離株低コピーウイルスパネルを鑄型として、S-60セット、および他の2つの研究グループ（JRCおよびウイルス第1部）の核酸検査系を評価した。全ての株に対して8重測定を実施し、得られたCt値と検出率を評価した。その結果、総検出数はS-60

		Positive / 8 replicates		
J1	SPL030	5	8	7
	SPL067	3	3	1
	SPL070	6	3	3
	SPL120	4	3	3
J2	SPL057	4	4	2
	SPL100	3	4	1
J3	SPL004	4	3	5
	SPL230	4	3	2
C3	HB29	3	4	2
C4	SPL179	3	3	2
C5	SPL087	5	3	4
	SPL238	4	4	3
		48	45	35



においてそれぞれ48、45、35であった。また、Ct値の比較ではS-60セットとJRCセットは同等であったが、両セットはウイルス第1部セットと比較して有意に低いCt値を示した。

D . 考察

SFTSV に対する核酸検査法は、診断用には確立されているものの、血液スクリーニング用としては整備されていない。そのため、SFTSV が血液に僅かに混入した場合でも検出が可能な高感度の検出法の開発を早急に行う必要がある。

本研究で実施する核酸検査法の確立手法は、網羅的な大規模プライマースクリーニングと、ウイルスパネルを用いた広範囲の検出域を示すプローブのスクリーニングから成り立っている。これらの多段階のスクリーニングを経ることで、高感度オリゴセットを同定し、極めて優れた核酸検査法の確立が可能であると考えられる。本年度までに他の研究グループによる核酸検査系と同等以上の検査系の開発に成功したと考えられる。

本研究において開発される SFTSV の検査法は、今後の血液スクリーニング用の核酸検査法の1つとして活用が期待される。

E . 結論

本研究により開発されるSFTSVの高感度検出系は、供血者の血液へのウイルス混入を高感度に検出することで、受血者の感染リスクを軽減することが可能と考えられ、献血血液等のスクリーニングへの活用が期待される。本開発は、SFTSVに関する血液安全対策の準備・整備の一環となり、この活用は

血液製剤の安全性強化と安定供給の確保に  
繋がると考えられる。

F．研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし